

**PERBANDINGAN PENGGUNAAN PENGECER SEMEN
SITRAT KUNING TELUR DAN TRIS KUNING TELUR TERHADAP
PERSENTASE DAYA HIDUP SPERMATOZOA
SAPI JAWA BREBES**

D. Hartanti, E. T. Setiatin dan Sutopo

ABSTRAK

Masalah utama pada perkembangbiakan sapi Jawa Brebes adalah keterbatasan jumlah pejantan unggul dan terjadinya perkawinan silang dengan bangsa lain karena dipelihara secara *umbaran*. Guna mempertahankan kemurnian turunan dari sapi Jabres perlu dilakukan upaya manipulasi bioteknologi reproduksi, yaitu dengan Inseminasi Buatan (IB). Upaya optimalisasi pengolahan semen agar diperoleh kualitas semen yang optimal dapat dilakukan melalui pemilihan jenis pengencer semen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan pengencer semen sitrat kuning telur dan tris kuning telur terhadap daya hidup spermatozoa sapi Jawa Brebes. Penelitian dilaksanakan bulan Agustus-September 2011 di Kelompok Tani Ternak (KTT) Cikoneng Sejahtera di Desa Malahayu, Kecamatan Banjarharjo, Kabupaten Brebes, Jawa Tengah. Materi yang digunakan dalam penelitian yaitu semen yang ditampung dari 5 ekor pejantan sapi Jawa Brebes. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) terdiri dari 5 ekor sapi Jabres dengan 3 macam perlakuan (T1 = tanpa pengencer; T2 = pengencer sitrat kuning telur dan T3 = pengencer tris kuning telur). Parameter yang diamati yaitu persentase daya hidup spermatozoa dari lama spermatozoa mampu bertahan hidup sampai dengan tingkat daya hidup 0% pada pengamatan 0-9 jam dengan interval pengamatan 1 jam dan setiap sampel diamati oleh 3 orang panelis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa interval jam ke-0 didapatkan T1 mempunyai perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap T2 dan T3. Pada interval jam ke-1 setelah diencerkan, persentase daya hidup spermatozoa T2 maupun T3 menunjukkan adanya relatif angka yang lebih tinggi dibandingkan T1. Pada interval jam ke-2, persentase daya hidup spermatozoa T1 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan T2 maupun T3. Pada interval jam ke-3 setelah diencerkan, persentase daya hidup spermatozoa T2 maupun T3 menunjukkan adanya relatif angka yang lebih tinggi dibandingkan T1. Pada interval jam ke-4, T1 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan T2 dan T3, sedangkan T2 dan T3 tidak berbeda. Berdasarkan pengamatan interval jam ke-1, ke-3, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8 dan ke-9, perlakuan T1, T2 dan T3 tidak terdapat perbedaan ($P > 0,05$) terhadap persentase daya hidup spermatozoa. Kesimpulan dari penelitian adalah pengencer sitrat kuning telur dan tris kuning telur mempunyai pengaruh yang sama terhadap kemampuan daya hidup spermatozoa pada berbagai interval pengamatan setelah pengenceran. Persentase daya hidup spermatozoa semakin menurun pada pengamatan interval pertama sampai sembilan jam setelah diencerkan.

Kata kunci : interval pengamatan, daya hidup, pengencer semen, sapi Jawa Brebes

**COMPARISON OF YOLK EGG CITRATE ACID AND YOLK EGG TRIS
AS SEMEN DILUTER ON PERCENTAGE OF SPERM VIABILITY IN
BREBES JAVANESE CATTLE**

DWI HARTANTI

ABSTRACT

The major problem in Brebes Javanese cattle breeding is the limited number of superior males and the occurrence of cross-breeding with other breed and traditional (umbaran) maintained. In order to maintain the purity derived from Brebes Javanese cattle bovine, it's necessary to attempt reproduction biotechnology manipulations, one of them is the Artificial Insemination (AI). Efforts to optimize the processing of semen in order to obtain optimal semen quality can be made through the choice of cement diluents. This study aimed to determine the effect of using yolk egg citrate acid diluents and yolk egg tris against Brebes Javanese bovine sperm viability. The experiment was conducted in August-September 2011 in the Livestock Farmers (KTT) Cikoneng Sejahtera Malahayu Village, District Banjarharjo, Brebes regency, Central Java. The materials used in this study were semen collected from 5 heads of Brebes Javanese cattle. Experimental design used was Randomized Block Design (RBD) consists of 5 Jabres cattles with 3 kinds of treatment (T1 = without diluter; T2 = yolk egg citrate acid and T3 = yolk egg tris). Parameters observed were the percentage of spermatozoa viability from the length of spermatozoa survival to 0% survival rate at 0-9 hours observation by observation interval of 1 hour and each sample was observed by 3 panelists. The results showed that at 0 interval hours, T1 has obtained significant differences ($P < 0.05$) to T2 and T3. In the first hour interval safter dilution, the percentage of spermatozoa viability T2 and T3 showed a higher relative rate than T1. In the second hours interval, the percentage of spermatozoa viability T1 significantly different ($P < 0.05$) to T2 and T3. In the third hour interval safter dilution, the percentage of spermatozoa viability T2 and T3 showed a higher relative rate than T1. In the fourth hour interval, T1 significantly different ($P < 0.05$) to T2 and T3, but T2 and T3 were not different. Based on the observation at the 1st, 3rd, 5th, 6th, 7th, 8th and 9th of hours intervals, there were no differences ($P > 0.05$) among treatment T1, T2 and T3 on the percentage viability of spermatozoa. The conclusion of the study is the yolk egg citrate acid and yolk egg tris has the same impact onthe viability of spermatozoa at various intervals of observati on after dilution. The percentage of spermatozoa viability decrease during the first observation intervals up to nine hours after dilution.

Key words : observation interval, viability, semen diluter, Brebes Javanese cattle

PENDAHULUAN

Sapi Jawa Brebes atau sapi Jabres merupakan plasma nutfah sapi Indonesia yang perlu dilestarikan. Sapi Jabres merupakan sapi lokal yang berasal dari persilangan *Bos indicus* dan *Bos sondaicus* serta terdapat pula darah turunan dari *Bos taurus* (Sutopo *et al.*, 2001). Karakteristik sapi Jabres yaitu warna bulu pada garis punggung adalah coklat kehitaman, bulu ujung ekor warna hitam, pada bagian kepala coklat kemerahan atau coklat kehitaman dan di bagian kening sering didapatkan warna putih berbentuk belah ketupat, warna putih melingkari bagian mata, tidak berpunuk, tanduk pendek runcing (Soeroso, 2004).

Masalah utama pada perkembangbiakan sapi Jabres adalah keterbatasan jumlah pejantan unggul dan terjadinya perkawinan silang dengan bangsa lain karena dipelihara secara *umbaran*. Pemeliharaan secara *umbaran* dapat menyebabkan perkawinan alam yang tidak terkontrol dan dimungkinkan terjadi perkawinan antar bangsa. Oleh karena itu, guna mempertahankan kemurnian turunan dari sapi Jabres perlu dilakukan upaya manipulasi bioteknologi reproduksi. Salah satu upaya tersebut dapat dilakukan melalui Inseminasi Buatan.

Upaya optimalisasi pengolahan semen agar diperoleh kualitas semen yang optimal dapat dilakukan melalui pemilihan jenis pengencer semen. Toelihere (1993) menyatakan bahwa pengencer harus dapat menyediakan zat-zat makanan, mencegah perubahan pH, mencegah pertumbuhan kuman, melindungi sperma dari cekaman dingin serta memperbanyak volume semen. Syarat bahan pengencer adalah harus dapat menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan, harus memungkinkan sperma dapat bergerak secara progresif, tidak bersifat racun, menjadi penyanggah bagi sperma, dapat melindungi dari cekaman dingin (*cold shock*) baik untuk semen beku maupun semen cair (Solihati dan Kune, 2011).

Kualitas semen yang dihasilkan dapat diketahui dengan melakukan pemeriksaan semen. Pemeriksaan semen terdiri dari dua cara yaitu secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis antara lain volume, warna, bau semen, pH, konsistensi. Pemeriksaan secara mikroskopis terdiri dari

gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi dan morfologi spermatozoa (Toelihere dan Taurin, 1979).

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam penanganan semen agar daya hidup sel spermatozoa tidak cepat menurun, yaitu menghindari panas suhu yang berlebihan, berhubungan dengan udara terlalu lama, terkena sinar matahari secara langsung dan menghindari guncangan yang berlebihan (Toelihere, 1993). Daya hidup spermatozoa di luar tubuh sangat rendah dan mudah mengalami kematian (Partodiharjo, 1992).

MATERI DAN METODE

Penelitian mengenai Perbandingan Penggunaan Pengencer Semen Sitrat Kuning Telur dan Tris Kuning Telur terhadap Persentase Daya Hidup Spermatozoa Sapi Jawa Brebes dilaksanakan bulan Agustus-September 2011 di Kelompok Tani Ternak (KTT) Cikoneng Sejahtera di Desa Malahayu, Kecamatan Banjarharjo, Kabupaten Brebes, Jawa Tengah.

Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian yaitu semen yang ditampung dari 5 ekor pejantan sapi Jabres dengan umur berbeda. Bahan yang digunakan meliputi kuning telur, sodium sitrat, tris, fruktosa, asam sitrat, air hangat, alkohol 70%, penisilin, akuabides, indikator pH, NaCl fisiologis 0,9%, larutan eosin 2%, larutan eosin 0,2% dan spirtus. Peralatan yang digunakan meliputi vagina buatan, kandang penjepit betina, *water heater*, tambang, tabung berskala, mikroskop, gelas Beaker, *alumunium foil*, gelas objek, gelas penutup, pipet dan kertas tisu, alat tulis.

Metode

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap pelaksanaan yaitu tahap persiapan, tahap perlakuan, dan tahap analisis data. Tahap persiapan penelitian meliputi pengadaan materi, proses adaptasi dan persiapan alat dan bahan.

Tahap perlakuan meliputi penyiapan *stock solution* (sitrat kuning telur dan tris kuning telur). Penampungan semen penampungan semen dilakukan oleh 1 orang, menunggu hingga pejantan menaiki betina, kemudian memasukkan penis pejantan ke dalam vagina buatan. Evaluasi semen secara makroskopis meliputi volume, warna, bau, pH, konsistensi semen dan secara mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi, hidup mati spermatozoa dan abnormalitas semen. Pengenceran semen dilakukan dengan cara membagi tiga bagian semen yang telah didapatkan. Satu bagian tidak diencerkan dan dua bagian semen diencerkan dengan sitrat kuning telur dan tris kuning telur. Perhitungan volume pengencer (Dahmani, 2011) sebagai berikut : volume pengencer sama dengan volume semen dikalikan konsentrasi dikalikan *progressive motility* dibagi dosis IB, kemudian hasilnya dikurangi volume semen dan pengamatan persentase daya hidup spermatozoa.

Pemeriksaan daya hidup spermatozoa dengan cara membuat preparat dengan cara meneteskan semen pada gelas objek kemudian ditutup gelas penutup, kemudian mengamati preparat tersebut di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 10. Penilaian didasarkan pada banyaknya spermatozoa yang bergerak maju yang dinyatakan dalam persen (%) dengan nilai 0 - 100. Pengamatan dilakukan setiap jam, sampai dengan spermatozoa mati. Pemeriksaan persentase daya hidup spermatozoa dilakukan melalui 3 orang panelis untuk mengurangi subjektivitas.

Rancangan yang digunakan dalam penelitian adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) terdiri dari 5 ekor sapi Jabres dengan 3 macam perlakuan (T1 = tanpa pengecer; T2 = pengencer sitrat kuning telur dan T3 = pengencer tris kuning telur) terhadap persentase daya hidup spermatozoa. Data persentase yang diperoleh ditransformasikan dengan menggunakan *Arc sine transformation for proportion*. Homogenitas data dilakukan dengan cara data persentase yang bernilai 0% diganti dengan nilai dari $1/4n$ dan nilai 100% diganti dengan $100 - 1/4n$ (Snedecor dan Cochran, 1989). Kriteria pengujian : data dianalisis dengan analisis ragam, apabila terdapat pengaruh perlakuan maka dilanjutkan dengan uji jarak Ganda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian, kualitas semen secara makroskopis menunjukkan bahwa volume semen pada sapi Jabres berkisar antara 3,2-7,3 ml; warna semen krem dan putih susu, derajat keasaman atau pH 6,4; konsistensi semen encer dan hanya dari satu ekor sapi yang konsistensinya sedang. Bau sperma adalah khas atau spermin. Hal ini tidak sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2000) bahwa volume semen sapi berkisar antara 5-8 ml/ejakulasi.

Kualitas semen sapi Jabres secara mikroskopis berupa gerakan massa adalah +1 dan +2. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Arifiantini *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa gerakan massa pada sapi lokal lainnya seperti sapi Bali diperoleh rata-rata sebesar 2,7 setara dengan (++/+++) yang disebabkan karena kondisi ternak maupun lingkungan. Pada sapi Bali gerakan individu berkisar 60-70%; persentase hidup spermatozoa mulai dari 62,62-76,21%, sedangkan untuk persentase mati spermatozoa adalah 23,79-37,38%. Gerak individu berkisar antara 60-70%. Partodihardjo (1992) menyatakan bahwa persentase sperma yang bergerak lurus ke depan pada sapi umumnya 50-80%. Jika hal ini dihubungkan dengan hasil penelitian, maka dapat dinyatakan bahwa gerak individu semen sapi Jabres masih pada kisaran normal.

Abnormalitas spermatozoa sapi Jabres berkisar antara 9,32-29,2%. Hal ini sesuai dengan pendapat Dahmani (2011) bahwa semen dengan kualitas tinggi adalah yang mempunyai sisi abnormalitas 5-15%; kualitas sedang 10-20% dan kualitas rendah lebih dari 30%. Lebih lanjut dinyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa pada sapi harus kurang 20% dan konsentrasi spermatozoa berkisar antara 22×10^7 - 173×10^7 spermatozoa/ml. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi (173×10^7 spermatozoa/ml) dimiliki oleh sapi Jabres nomor 4 yang memiliki konsistensi semen sedang. Dapat dijelaskan lebih lanjut bahwa pada kasus tertentu, sapi Jabres memiliki konsentrasi semen lebih tinggi dari sapi FH maupun sapi Bali. Arifiantini *et al.* (2005) menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa sapi Friensian Holstein (FH) sebesar $1.093,66 \times 10^6$ sel sperma/ml, dan Arifiantini *et al.* (2006) bahwa konsentrasi spermatozoa pada sapi Bali sebesar 1.340×10^6 sel sperma/ml.

Berdasarkan pengamatan persentase daya hidup spermatozoa yang dilakukan pada interval yang berbeda selama sembilan jam diperoleh rata-rata pengamatan daya hidup spermatozoa (Tabel 1) sebagai berikut :

Tabel 1. Rata-rata Persentase Daya Hidup Spermatozoa Sapi Jabres pada Interval Waktu yang Berbeda

Waktu pengamatan	Daya Hidup Spermatozoa		
	T1	T2	T3
------(jam)-----	------(%)-----		
0	62 ^a	52 ^b	52 ^b
1	30	38	40
2	11 ^b	29 ^a	28 ^a
3	7	21	21
4	2 ^b	17 ^a	14 ^a
5	0	12	8
6	0	7	5
7	0	4	2
8	0	2	1
9	0	0	0

Superskrip huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata ($P < 0,05$); T1 = Tanpa pengencer; T2 = Sitrat kuning telur; T3 = Tris kuning telur.

Berdasarkan Tabel 1 diperoleh data pengamatan semen tanpa pengencer (T1) dan semen yang menggunakan pengencer sitrat kuning telur (T2) serta tris kuning telur (T3). Pengamatan tersebut dilakukan setelah ejakulat (0 jam) sampai 9 jam dengan interval pengamatan satu jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada nol jam pertama didapatkan semen tanpa pengencer (T1) mempunyai perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap semen yang menggunakan pengencer sitrat kuning telur (T2) maupun tris kuning telur (T3). Persentase yang dimiliki semen tanpa pengencer menunjukkan angka yang lebih tinggi dibandingkan dengan semen yang menggunakan pengencer sitrat kuning telur maupun tris kuning telur. Hal ini diduga karena pada semen segar atau semen tanpa pengencer masih mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk bertahan hidup sampai waktu tertentu, sedangkan setelah diberi pengencer persentase

hidupnya rendah karena dimungkinkan spermatozoa mengalami adaptasi terhadap perbedaan kondisi pada pengencer.

Pada Tabel 1, nampak bahwa persentase daya hidup sperma dalam T2 maupun T3 menunjukkan adanya relatif angka yang lebih tinggi dibandingkan dengan T1 pada interval jam pertama setelah diencerkan, tetapi T1, T2 maupun T3 tidak berbeda ($P>0,05$). Selanjutnya pada pengamatan interval jam ke-2 ditunjukkan bahwa persentase daya hidup spermatozoa T1 berbeda nyata ($P<0,05$) dengan semen yang menggunakan perlakuan penambahan pengencer (T2 dan T3).

Pengamatan persentase daya hidup sperma dalam T2 maupun T3 menunjukkan adanya relatif angka yang lebih tinggi dibandingkan dengan T1 pada interval jam ke-3 setelah diencerkan, tetapi T1, T2 maupun T3 tidak berbeda ($P>0,05$). Pengamatan persentase daya hidup pada interval jam ke-4 menunjukkan persentase spermatozoa yang semakin menurun. T1 berbeda nyata ($P<0,05$) dengan T2 dan T3, sedangkan T2 dan T3 tidak berbeda.

Berdasarkan pengamatan interval jam ke-1, ke-3, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8 dan ke-9 menunjukkan bahwa perlakuan T1, T2 dan T3 tidak terdapat perbedaan ($P>0,05$) terhadap persentase daya hidup spermatozoa. Pada interval jam ke-1, T1 mengalami penurunan yang tinggi yaitu mencapai 32% ($62-30=32$); pada T2 terjadi penurunan daya hidup spermatozoa sebesar 14% ($52-38=14$), sedangkan T3 mengalami penurunan sebesar 12% ($52-40=12$). Pada jam ke-3, T1 mengalami penurunan mencapai 4% ($11-7=4$); sedangkan T2 penurunan daya hidup mencapai 9% ($38-29=9$), T3 penurunannya lebih besar, yaitu 12% ($40-28=12$).

Hal tersebut diduga karena pada interval jam ke-1 maupun ke-9, spermatozoa sudah tidak mampu bertahan hidup karena pengaruh lingkungan di luar tubuh dan jumlah produksi asam laktat yang tinggi yang menyebabkan spermatozoa mati. Sugiarti *et al.* (2004) menyatakan bahwa keadaan penyimpanan dalam jangka waktu yang lama menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa akibat adanya asam laktat hasil proses metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam. Kondisi ini dapat bersifat racun terhadap spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian sperma.

Berdasarkan pengamatan persentase daya hidup spermatozoa diketahui bahwa perlakuan T1, T2 dan T3 menunjukkan hasil persentase daya hidup spermatozoa yang relatif berbeda-beda setelah pengenceran. Pada pengamatan interval nol jam setelah pengenceran, spermatozoa masih menunjukkan persentase daya hidup di atas 50%. Hal ini dapat dimaknai bahwa kualitas spermaozoa masih dapat digunakan untuk inseminasi buatan (IB). Namun pada interval dua jam setelah pengenceran, spermatozoa secara drastis menurun kualitas daya hidupnya hingga sampai pengamatan interval jam ke-9. Hasil penelitian Hidayatin (2002) menyatakan bahwa dibutuhkan 50% spermatozoa yang hidup dan motil untuk dipakai dalam IB.

Pengencer sitrat kuning telur dan pengencer tris kuning telur mempunyai pengaruh yang sama, yaitu sitrat dan tris dapat mengendalikan larutan penyanggah dalam mempertahankan pH larutan. Hal ini sesuai dengan pendapat Salisbury dan VanDemark (1985) bahwa sitrat memiliki struktur melingkar dan mengikat kalsium atau logam berat dan memisahkan butir-butir lemak kuning telur sehingga spermatozoa dapat mudah dilihat di bawah mikroskop. Sesuai dengan pendapat Ax *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa pengencer tris mempunyai beberapa kelebihan antara lain dapat mempertahankan pH, mempertahankan tekanan osmotik dan menjaga keseimbangan elektrolit.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer sitrat kuning telur dan tris kuning telur mempunyai pengaruh yang sama terhadap kemampuan daya hidup spermatozoa pada berbagai interval pengamatan setelah pengenceran. Persentase daya hidup spermatozoa semakin menurun pada pengamatan interval pertama sampai sembilan jam setelah diencerkan.

DAFTAR PUSTAKA

Arifiantini, I., T.L. Yusuf, dan D. Yanti. 2005. Kaji banding kualitas semen beku sapi Friesian Holstein menggunakan pengencer dari berbagai Balai inseminasi buatan di Indonesia. *J. Animal Production* **7** (3) : 168–176.

- Arifiantini, I., T. Wresdiyati, dan E.F. Retnani. 2006. Pengujian morfologi spermatozoa sapi Bali (*Bossondaicus*) menggunakan pewarnaan "Williams". *J. Indonesian Tropical Animal Agriculture* **31** (2) : 105-110.
- Ax, R.L., M. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varue, B. Hafez, and M.E. Bellin. 2000. Artificial Insemination **In** : B. Hafez and E.S.E. Hafez (Eds.). *Reproduction In Farm Animals*. 7th Edition. Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Dahmani, Y. 2011. Semen Evaluation Methods in Cattle. Magapor R&D Department. http://www.magapor.com/images/Veterinarios/iDoc_18.pdf. Diakses tanggal 28 Oktober 2011.
- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. **In** : B. Hafez and E. S. E. Hafez (Eds.). *Reproduction In Farm Animals*. 7th Edition. Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Hidayatin, D. 2002. Kaji Banding Kualitas Semen Beku Produk BIB Lembang dan Singosari pada Setiap Jalur Distribusi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor. (Skripsi Sarjana Kedokteran Hewan)
- Partodihardjo. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya, Jakarta.
- Salisbury, G.W., dan N.L. VanDemark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Universitas Gadjah Mada Press, Yogyakarta (Diterjemahkan oleh R. Djanuar).
- Snedecor, G.W. dan W.G. Cochran. 1989. *Statistical Methods*. 8th Edition. Iowa State University Press.
- Soeroso. 2004. Performans Sapi Jabres Berdasarkan Sifat Kuantitatif dan Kualitatif. Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, Semarang. (Tesis Magister Peternakan)
- Solihati, N., dan P. Kune. 2011. Pengaruh jenis pengencer terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa semen cair sapi Simmental. http://pustaka.unpad.ac.id/wp-content/uploads/2009/03/pengaruh_jenis_pengencer_terhadap_motilitas.pdf. Diakses tanggal 28 Oktober 2011.
- Sugiarti, T., E. Triwulanningsih, P. Situmorang, R.G. Sianturi, dan D.A. Kusumaningrum. 2004. Penggunaan katalase dalam produksi semen dingin sapi. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 215–220.
- Sutopo, K. Nomura, Y. Sugimoto, and T. Amano. 2001. Genetic relationship among Indonesian native cattle. *J. Animal Genetic* **28** (2) : 3-11.
- Toelihere, M. R. dan M. B. Taurin. 1979. Semen Beku. Edisi Ketiga. Departemen Reproduksi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi Buatan pada Temak. Angkasa, Bandung.